

# Über die bei der Hydrolyse der Eiweißsubstanz der Lupinensamen entstehenden Monoaminosäuren.

Von

**E. Winterstein** und **E. Pantanelli.**

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1905.)

Von den pflanzlichen Eiweißsubstanzen ist bis jetzt das Edestin die einzige, auf deren Spaltungsprodukte die Estermethode von E. Fischer angewendet worden ist. Im Hinblick auf die von E. Schulze und seinen Mitarbeitern im hiesigen Laboratorium erhaltenen Ergebnisse über das Auftreten von Aminosäuren in Keimpflanzen muß es als wünschenswert bezeichnet werden, zu untersuchen, welche Aminosäuren aus den in den bezüglichen Samen darstellbaren Eiweißsubstanzen entstehen. Darüber läßt sich am besten mit Hilfe der Fischerschen Methode Aufschluß erhalten.

Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, welche Aminosäuren aus dem Eiweiß der Lupinensamen entstehen. Was die Darstellung dieser Eiweißsubstanz betrifft, so wurde die Methode von Ritthausen benutzt, welche bekanntlich darin besteht, daß man die zerkleinerten und entfetteten Samen mit höchst verdünnter Natronlauge in der Kälte behandelt und das schwach alkalische Filtrat mit Essigsäure neutralisiert. Allerdings erhält man dabei keine einheitlichen Substanzen, bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich aber darum, die Eiweißsubstanz möglichst vollständig zu gewinnen, weil es ja auf einen Vergleich der dabei erhaltenen Produkte mit denen in den Keimpflanzen vorhandenen ankam und weil an dem Eiweißumsatz wahrscheinlich doch alle vorhandenen Eiweißstoffe sich beteiligen.

Wir verwendeten ein aus *Lupinus albus* und *Lupinus hirsutus* dargestelltes Eiweißpräparat. Die nach dem genannten Verfahren dargestellte Eiweißsubstanz wurde nach dem Ausfällen mit verdünnter Essigsäure mit Wasser und Alkohol ausgewaschen, unter absolutem Alkohol entwässert und zuletzt mit Äther ausgewaschen. Sie bildete ein weißes leicht zerreibliches Pulver.

Für die Hydrolyse verwendeten wir 200 g dieses Pulvers, welches mit einem Liter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 ca. 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht wurde. Die Zersetzungsflüssigkeit wurde im Vacuum zum Sirup eingedunstet, sodann wieder mit Salzsäure gesättigt, einige Kriställchen Glutaminsäure hinzugefügt und drei Tage im Eisschrank stehen gelassen; dabei schied sich eine dunkelgefärbte amorphe Masse aus, eine kristallinische Ausscheidung konnten wir nicht beobachten. Wahrscheinlich verhinderten die in größerer Menge vorhandenen Huminsubstanzen das Auskristallisieren der Glutaminsäure. Der Sirup wurde nun samt der erwähnten Ausscheidung 3 mal mit ca. einem Liter Alkohol nach der Methode von Fischer verestert und die Ester mit Hilfe von Natronlauge, Pottasche und Äther in Freiheit gesetzt. Bei der Veresterung war infolge eines Unfalls ein Teil der Substanz verloren gegangen. Daher erhielten wir eine relativ geringe Ausbeute an Estern. Die Ester wurden bei 7—8 mm Druck destilliert. Wir erhielten folgende Fraktionen.

Fraktion	Temperatur	Gewicht
I	20—40°	6 g
II	40—65°	12,4 »
III	65—85°	30,9 »
IV	85—130°	8,5 »
V	130—150°	7,3 »
VI	150—180°	13,8 »
VII	180—185°	4,7 »
		<hr/> 83,6 g

Im Kolben verblieb ein brauner Rückstand, dessen Quantität 26 g betrug. Dieser Rückstand wurde in heißem Alkohol gelöst; aus der alkoholischen Lösung schieden sich in der Kälte allmählich Kristalle aus, deren Quantität nicht ausrei-

chend war, um eine genauere Untersuchung durchzuführen. Bei der Untersuchung der einzelnen Fraktionen erhielten wir folgende Ergebnisse:

### Fraktion I.

Die 6 g Ester wurden mit Salzsäure gesättigt, mit etwas Alkohol versetzt und nach dem Einimpfen von Glykokollesterchlorhydrat im Eisschrank stehen gelassen. Eine kristallinische Ausscheidung trat nicht ein, somit war die Abwesenheit von Glykokoll konstatiert. Die Flüssigkeit wurde nun wiederholt mit Wasser eingedampft, die noch vorhandene Salzsäure mit Bleihydroxyd entfernt, und die vom Blei, mit Hilfe von Schwefelwasserstoff, befreite Lösung zur Kristallisation eingedunstet. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden mit Hilfe von Kupferhydroxyd in das Kupfersalz verwandelt. Aus der konzentrierten Lösung schieden sich blättrige Kristalle aus, welche von der Mutterlauge getrennt wurden. Die daraus mit Hilfe von Schwefelwasserstoff regenerierte Verbindung besaß einen Gehalt von 14,58% N.

0,1386 g Substanz gaben 11,4 ccm N bei 18° und 724 mm.

Da der N-Gehalt des Alanins 15,72% beträgt, so lag wohl ein Gemisch von letzterem mit einer höheren Aminosäure vor. Die von den blättrigen Kristallen getrennte tiefblau gefärbte Mutterlauge wurde nahezu zur Trockne eingedunstet, die Kristalle auf einer Tonplatte von der Mutterlauge befreit. Diese Kristalle bestanden aus Alaninkupfer. Sie besaßen einen Gehalt von 26,20% Cu und 11,57% N. Die Theorie verlangt 26,30% Cu und 11,61% N.

0,200 g Substanz gaben 0,0524 g CuO

0,2250 » » » 23,6 ccm N bei 720 mm und 16°.

### Fraktion II.

Die 12,4 g Ester wurden am Rückflußkühler mit Wasser gekocht, aus der wässrigen Lösung wurden vier Kristallfraktionen hergestellt. Die erste gab mit Kupferacetat einen blauen Niederschlag vom Aussehen des Leucinkupfers, dasselbe wurde

nicht weiter untersucht. Die letzte Fraktion gab mit Kupferhydroxyd eine tiefblaue Lösung, aus dieser wurden 0,8 g Alankupfer isoliert. Die beiden mittleren Fraktionen wurden mit Kupferhydroxyd gekocht, die tiefblauen Lösungen eingedunstet, die ausgeschiedenen blättrigen Kristalle wurden mit Methylalkohol ausgekocht, die tiefblaue Lösung vom Rückstand getrennt und der Methylalkohol auf dem Wasserbade verjagt.

Der Rückstand wurde aus Wasser umkristallisiert: es wurden auf diese Weise 0,5 g eines Kupfersalzes gewonnen, dessen Kupfer und Stickstoffgehalt auf aminovaleriansaures Kupfer stimmte.

0,153 g Substanz gaben 13,6 ccm N bei 720 mm und 16°  
= 0,0425 g N = 9,8%.

0,200 g Substanz gaben 0,0532 g CuO = 0,0425 g Cu = 21,24%.

Die Theorie verlangt 9,47% N und 21,46% Cu.

### Fraktion III.

Beim Kochen der Ester mit Wasser schied sich ein hellgelb gefärbtes, schwefelhaltiges Öl aus, welches nach dem Verseifen im Scheidetrichter von der Lösung getrennt wurde: die Flüssigkeit wurde zur Trockne eingedunstet, der Rückstand mit absolutem Alkohol in der Wärme zweimal extrahiert. Die alkoholische Lösung wurde mit den aus den folgenden Fraktionen erhaltenen vereinigt.

Der beim Behandeln mit absolutem Alkohol verbliebene Rückstand wurde in heißem Wasser gelöst und zur Kristallisation eingedunstet, die nach längerem Stehen ausgeschiedenen Kristalle wurden von der Flüssigkeit getrennt und der Rückstand nochmals aus Wasser umkristallisiert, auf diese Weise wurden 6 g einer Aminosäure erhalten, welche im Verhalten dem Leucin gleich, sie sublimierte vollständig, eine wässrige Lösung der Substanz gab mit Kupferacetat eine blaue kristallinische Ausscheidung, die Flüssigkeit war nach dem Erkalten nur schwach gefärbt. Eine weitere Untersuchung wurde mit dieser Substanz nicht ausgeführt. Die Mutterlaugen vom Leucin wurden eingedunstet, bis eine neue Ausscheidung von Aminosäuren eintrat, die ausgeschiedenen Kristalle wurden von der

Flüssigkeit getrennt und aus Wasser umkristallisiert, es resultierten blendend weiße Blättchen von einheitlichem Aussehen, von diesen wurde eine Elementaranalyse und eine N-Bestimmung nach Dumas mit folgendem Ergebnis durchgeführt:

0,2010 g Substanz gaben 0,1840 g  $H_2O$  und 0,4062 g  $CO_2$   
 = 10,14% H und 55,11% C.

0,2220 g Substanz gaben 22,2 ccm Gas bei 716 mm und  $16^\circ = 10,95\%$ .

Aus der Formel  $C_6H_{13}NO_2$  berechnet sich ein Gehalt von 10,01% H, 54,91% C und 10,68% N. Obige Zahlen stimmen also gut auf Leucin. Die Kristalle wurden mittels Kupferhydroxyd in das Kupfersalz verwandelt, die ausgeschiedenen Kristalle getrocknet und mit warmem Methylalkohol behandelt, wobei eine blau gefärbte Lösung resultierte, die vom Ungelösten getrennte methylalkoholische Lösung wurde eingedunstet, es hinterblieben 0,3 g eines Kupfersalzes, dessen Cu-Gehalt 19,64% betrug.

0,2500 g Substanz gaben 0,0615 g  $CaO = 0,0491$  g Cu.

Da nach den Angaben von F. Ehrlich<sup>1)</sup> und auch nach den in unserem Laboratorium ausgeführten Untersuchungen das Kupfersalz des gewöhnlichen Leucins im Methylalkohol unlöslich ist, so schloß das analysierte Leucinpräparat etwas Isoleucin ein.

#### Fraktion IV.

Die Ester wurden mit Äther und Wasser geschüttelt, um den Phenylninester abzuscheiden, die wässrige Lösung am Rückflußkühler gekocht, wobei auch hier eine kleine Menge eines schwefelhaltigen Öls scheinbar unverseift zurückblieb, die davon getrennte wässrige Lösung der Aminosäuren wurde zur Trockne eingedunstet, der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Die aus dieser Fraktion erhaltene alkoholische Lösung wurde mit derjenigen der vorhergehenden Fraktion vereinigt und der Destillation unterworfen: beim Behandeln des Destillationsrückstandes mit absolutem Alkohol in der Wärme verblieb noch ca. 1,5 g eines kristallinischen Rückstandes: die alkoholische Lösung gab 7 g eines Sirups, den wir nicht zur Kristallisation bringen konnten. Der Sirup wurde mit Kupferhydroxyd gekocht und die entstandenen Kupfersalze nach

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. XXXVII. S. 1809.

E. Fischer mittels Alkohol getrennt. Es wurde eine kleine Menge des im Alkohol unlöslichen Kupfersalzes der racemischen Pyrrolidinkarbonsäure erhalten. Das in Alkohol lösliche Kupfersalz gab nach dem Zerlegen mit Schwefelwasserstoff einen Sirup, der nicht kristallisieren wollte: ein Teil des letzteren wurde mit Phenylisocyanat und Lauge behandelt und die dabei erhaltene Verbindung mittels Salzsäure in das Anhydrid übergeführt, wir erhielten nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser ein in schönen Nadeln kristallisierendes, bei  $142^{\circ}$  schmelzendes Produkt. Nach E. Fischer schmilzt das Hydantoinderivat der  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure bei  $143^{\circ}$ .

#### Fraktion V und VI.

Die Ester wurden nach den Angaben Fischers auf Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure verarbeitet. Es wurden 5 g Phenylalanin, 8 g Asparaginsäure und 0,2 g Glutaminsäure erhalten.

Ein Versuch, aus diesen Fraktionen Serin mittels Naphtalinsulfochlorid<sup>1)</sup> zu isolieren, verlief resultatlos.

#### Fraktion VIII.

Das Estergemisch erstarrte nach kurzer Zeit kristallinisch. Dasselbe schloß anscheinend noch kleine Mengen Phenylalanin ein. Eine weitere Untersuchung der in dieser Fraktion enthaltenen Aminosäuren haben wir noch nicht durchgeführt. Es ist wohl nicht ausgeschlossen, daß die Untersuchung der höheren Fraktionen noch allerlei interessante Ergebnisse liefern wird.

Da das Konglutin beim Kochen mit Lauge und Bleiessig Bleisulfid gibt, so war auch zu prüfen, ob dieser Eiweißkörper bei der Spaltung mit Säuren Cystin liefert. Zur Isolierung dieses schwefelhaltigen Körpers benützten wir das von Patten<sup>2)</sup> angegebene Verfahren. Die durch 10stündiges Kochen von Konglutin mit ca. 35%iger Schwefelsäure erhaltene Flüssigkeit wurde mittels Baryt von der Schwefelsäure befreit, die erhaltene

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 489. Siehe auch E. Fischer und P. Bergell, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., 1902, S. 3779.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 353.

Lösung eingeengt und mit Merkurisulfat bei Anwesenheit von Schwefelsäure gefällt; der mit Schwefelsäure ausgewaschene und gut abgepreßte Niederschlag lieferte nach dem Zersetzen mit Schwefelwasserstoff und Eindunsten eine dunkelgefärbte Flüssigkeit, aus welcher sich allmählich sechsseitige Täfelchen ausschieden, welche die Bleireaktion gaben. Durch diesen Befund ist auch die Anwesenheit des Cystinkomplexes im Konglutin erwiesen. Die auf diesem Wege erhaltene Cystinmenge war aber im Vergleich zum Schwefelgehalt des Konglutins so gering, daß man wohl auch die Anwesenheit anderer schwefelhaltiger Gruppen annehmen muß. Im Einklang mit dieser Auffassung steht wohl die Bildung eines scheinbar nicht verseifbaren schwefelhaltigen Öls, das sich in den Fraktionen II, III und IV in nicht unbeträchtlicher Menge vorfand. Auch beim Zersetzen eines aus Kolostrum dargestellten schwefelreichen Albumins beobachteten wir in unserem Laboratorium das Auftreten eines schwefelhaltigen Öls, auch bei diesem Eiweißkörper war die Ausbeute an Cystin eine sehr geringe.

Da das Konglutin die Molischsche Reaktion mit  $\alpha$ -Naphthol und Schwefelsäure gibt, so wurden auch Versuche angestellt, reduzierende Substanz aus dem Konglutin abzuspalten. Die Versuche verliefen aber resultatlos. Da beim Behandeln der Samen mit Laugen auch Hemizellulosen in Lösung gehen können, so sollen diese Versuche mit pflanzlichen Eiweißsubstanzen durchgeführt werden, welche sich aus den Samen durch Extraktion mit Kochsalz gewinnen lassen.

### Zusammenfassung der Resultate.

Aus den bei der Hydrolyse der Eiweißsubstanzen der Lupinensamen entstehenden Produkte konnten folgende Monoaminosäuren isoliert werden: Alanin, Aminovaleriansäure, Leucin, Isoleucin,  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure, Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cystin. Auf Tyrosin haben wir nicht geprüft, da dasselbe schon früher von E. Schulze<sup>1)</sup> unter den Spaltungsprodukten des von uns untersuchten Eiweißkörpers nachgewiesen worden ist.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 63.

Von besonderem Interesse ist der Nachweis, daß  $\alpha$ -Pyrrolidin-karbonsäure in ansehnlicher Menge sich vorfand, während in den Keimpflanzen der Lupine diese Aminosäure nur in äußerst kleiner Menge gefunden werden konnte. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß beim Abbau der Eiweißstoffe in den Keimpflanzen ein Polypeptid, welches diese Aminosäure einschließt, gebildet wird.

Ferner ist von Interesse der Nachweis der Aminovaleriansäure unter den Spaltungsprodukten der von uns untersuchten Eiweißsubstanz, diese Aminosäure ist in den Keimpflanzen schon vor langer Zeit nachgewiesen worden, über ihre Bildungsweise in den Keimpflanzen konnte man bisher verschiedener Meinung sein:<sup>1)</sup> nachdem sie aber auch bei der Spaltung des bezüglichen Eiweißkörpers mit Salzsäure erhalten werden konnte, kann wohl kein Zweifel mehr darüber bestehen, daß sie auch in den Keimpflanzen als primäres Produkt des Eiweißabbaues entsteht. Da die von uns untersuchte Eiweißsubstanz stark die Reaktion mit Glyoxalsäure und Schwefelsäure auf Tryptophan gibt, so darf man wohl auch die Anwesenheit dieser Stickstoffverbindung als Baustein des Konglutins ansehen.

Der Nachweis des Isoleucins unter den Spaltungsprodukten der von uns untersuchten Eiweißsubstanz ist ein weiteres Beispiel für das Auftreten dieser Aminosäure unter den Produkten des Eiweißabbaues. Es sei hier darauf hingewiesen, daß schon E. Schulze und A. Likiernik<sup>2)</sup> es für möglich erklärt haben, daß unter den Spaltungsprodukten der Eiweißstoffe neben dem gewöhnlichen Leucin ( $\alpha$ -Aminoisobutyllessigsäure) noch eine andere Aminokapronsäure sich vorfindet. Sie machen darauf aufmerksam, daß man erst nach wiederholtem Umkristallisieren des Rohleucins reine  $\alpha$ -Aminoisobutyllessigsäure erhält und daß bei diesem Umkristallisieren ein etwa noch vorhandenes Leucin vollständig in die Mutterlauge übergeht.

<sup>1)</sup> O. Loew nimmt an, daß die Aminovaleriansäure aus dem Leucin hervorgehen kann. Die chemische Energie der lebenden Zelle, 1899, S. 81.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, 1893, Bd. XVII, S. 534.